



08-110 Siedlce, ul. 3-go Maja 54, pok. 117, 643 1104 e-mail: anna.kamecka@uph.edu.pl

Siedlce, 18 sierpnia 2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Chrzanowskiej
z tytułowanej**

**„Reaktywność metalonieorganicznych polipirydylowych kompleksów rutenu(II) i ich
zastosowanie jako katalizatory w procesie transferu jonu wodorkowego”**

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr Marty Chrzanowskiej została przygotowana pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Katafias, prof. UMK. Badania zostały wykonane w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej Wydziału Chemii na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu i mieszczą się w obszarze badawczym ww. Katedry.

W ciągu ostatnich kilku dekad obserwuje się intensywny rozwój chemii koordynacyjnej i metaloorganicznej metali przejściowych, w tym rutenu(II)/(III). Powodem nieustającego zainteresowania tą grupą związków kompleksowych jest szereg ich potencjalnych zastosowań m.in. w terapii fotodynamicznej, przeciwnowotworowej lub do kontrolowania równowagi redoks w komórkach. Projektowanie skutecznych środków terapeutycznych opartych na zawiązkach koordynacyjnych metali przejściowych wiąże się nie tylko z modyfikowaniem ich właściwości chemicznych, fizycznych i biologicznych poprzez wymianę ligandów w sferze koordynacyjnej kompleksu, ale także z wyjaśnieniem kinetyki i mechanizmu ich działania. W tym kontekście badania podjęte przez Doktorantkę, których temat został jasno i precyzyjnie określony w tytule pracy, doskonale wpisują się w nurt badań prowadzonych w kraju i za granicą, są aktualne, mają dużą wartość poznawczą i stanowią oryginalny wkład w rozwój tych badań.

Z formalnego punktu widzenia oceniana praca doktorska ma formę klasycznej rozprawy, została napisana w języku polskim i przedstawiona jest na 193 stronach maszynopisu. Tytuł rozprawy odpowiada przedstawionym w ramach pracy rezultatom badań, a cała dysertacja nie budzi zastrzeżeń pod względem poprawności struktury. Pracę otwiera *Wykaz stosowanych skrótów*, po którym następują *Streszczenie* w języku polskim i *Abstract* w języku angielskim oraz *Wprowadzenie*. Następnie Doktorantka przedstawiła zawarty w trzech rozdziałach *Przegląd literaturowy*, po czym określiła *Cele pracy i plan badań*. Badania własne opisane są w postaci

najobszerniejszej *Części eksperymentalnej*, a całość kończy cytowana *Literatura* (łącznie 160 pozycji). Należy podkreślić, że zdecydowana większość przywołanych w odnośnikach prac oryginalnych została opublikowana w ciągu ostatnich 10 lat, co świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu Doktorantki w bieżącej literaturze przedmiotu i potwierdza aktualność podjętej tematyki badawczej. Praca zawiera liczne, dobrze zaprojektowane rysunki (58), schematy (15) oraz tabele (18), które są bogatym źródłem informacji i ułatwiają zrozumienie materiału. Praca została napisana w sposób jasny i przejrzysty, a edycja pracy została wykonana starannie. Dodatkowo do pracy załączony został *Aneks* zawierający 28 tabel i 4 rysunki prezentujące m.in. wyniki badań strukturalnych, spektroskopowych i kinetycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska rozpoczyna się krótkim (3 strony), dość ogólnym *Wprowadzeniem*, w którym Doktorantka nakreśliła historię badań nad zastosowaniem związków koordynacyjnych metali w medycynie oraz uzasadniła potrzebę prowadzenia tego typu badań naukowych. Szczególną uwagę zwróciła na badania dotyczące aktywności przeciwnowotworowej związków Ru(III) oraz rosnące zainteresowanie badawcze ukierunkowane na projektowanie potencjalnych związków przeciwnowotworowych opartych na kompleksach Ru(II), które jak stwierdza Doktorantka, nie wymagają etapu aktywacji przez redukcję. To właśnie związki koordynacyjne rutenu(II) stanowią przedmiot badań podjętych przez Doktorantkę.

Przegląd literaturowy (46 stron), który został opracowany w oparciu o artykuły naukowe z okresu 2005-2021 (99 pozycji literaturowych), składa się z trzech rozdziałów tematycznych. W pierwszym z nich Doktorantka scharakteryzowała metaloleki katalityczne oparte na związkach koordynacyjnych metali przejściowych, które wykazują duży potencjał aplikacyjny w terapii fotodynamicznej, katalitycznych reakcjach enzymatycznych oraz reakcji transferu jonu wodorkowego. Kolejny rozdział tej części pracy dotyczy kompleksów metaloorganicznych jonu Ru(II) o potencjalnych właściwościach biologicznych. Mgr Marta Chrzanowska opierając się na prezentowanych w literaturze wynikach badań prowadzonych przez grupę prof. P. J. Sadlera z Uniwersytetu Warwick w Wielkiej Brytanii, jednego z pionierów badań nad poszukiwaniem metaloorganicznych kompleksów metali o potencjalnych właściwościach biologicznych, przybliżyła mechanizmy działania metaloorganicznych kompleksów Ru(II). W rozdziale tym zwróciła szczególną uwagę na wpływ sfery koordynacyjnej na mechanizm działania przeciwnowotworowego tego typu kompleksów. W ostatnim rozdziale Doktorantka omówiła zagadnienia związane z biologią redoksu komórki. Pokazała, że modulowanie równowagi redoks w komórkach (NAD^+/NADH) jest istotne z punktu widzenia stresu redukcyjnego i może być wykorzystane w nowoczesnych terapiach nowotworowych. Przedstawiony w tej części pracy materiał został przygotowany bardzo starannie, a także stanowi dobre uzasadnienie i wprowadzenie do podjętych przez Doktorantkę badań.

Z przeprowadzonego studium literaturowego wynika, że inspiracją podjętych przez Doktorantkę badań były głównie prace Sadlera i jego współpracowników poświęcone zastosowaniu metaloorganicznych kompleksów metali do modulowania równowagi redoks

w żywych komórkach. W rozdziale *Cele pracy i plan badań* Autorka stwierdziła, że lektura tych prac skłoniła ją do poszukiwania odpowiedzi na pytanie, czy związki metalonieorganiczne mogą być katalizatorami reakcji transferu anionu wodorkowego, istotnej dla biologii redoksowej, czy też tego typu zdolności katalityczne są unikatową cechą metaloorganicznych, arenowych kompleksów rutenu(II). Autorka sprecyzowała wiodące cele pracy doktorskiej następująco: *uzyskanie informacji na temat możliwości sterowania reaktywnością metalonieorganicznych związków koordynacyjnych Ru(II) w procesach substytucji liganda jednokleszczowego zachodzących w roztworach wodnych oraz zbadanie ich zdolności do katalizowania transferu wodorków w kontekście biologii redoksowej*. W tym rozdziale mgr Marta Chrzanowska nakreśliła również główne etapy pracy badawczej oraz przedstawiła szczegółowy plan badań.

Kolejny rozdział zatytułowany *Część eksperymentalna* obejmujący 118 stron jest podzielony na pięć podrozdziałów, z których trzy zawierają informacje dotyczące stosowanych odczynników, użytej aparatury naukowo-badawczej oraz szczegółowe opisy przeprowadzonych syntez kompleksów Ru(II). W ramach pracy Doktorantka otrzymała z wysoką wydajnością serię 5 kompleksów rutenu(II) (tj. $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{en})\text{Cl}]\text{Cl}$, $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})\text{Cl}]\text{Cl}$, $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{ampy})\text{Cl}]\text{Cl}$, $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{phen})\text{Cl}]\text{Cl}$ oraz $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{tmen})\text{Cl}]\text{ClO}_4$, gdzie terpy - 2,2':6',2''-terpirydina, en - etylenodiamina, bipy - 2,2'-bipirydina, ampy - 2-(aminometylo)pirydina, phen - 1,10-fenantrolina, tmen - N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina) stosując procedury opisane w literaturze. Dobór ligandów N,N-donorowych różniących się właściwościami elektronowymi i sterycznymi został starannie przemyślany, co pozwoliło otrzymać kompleksy o odmiennej labilności, istotnej w kontekście ich zdolności katalitycznych. Zsyntezowane związki kompleksowe zostały w pełni scharakteryzowane zarówno w roztworze jak i w ciele stałym. W tym celu Doktorantka wykorzystwała właściwe techniki badawcze takie jak spektroskopia ^1H , ^{13}C i ^{15}N NMR oraz spektroskopia elektronowa UV-Vis. Czystość kompleksów Ru(II) oraz ich skład stechiometryczny potwierdziła za pomocą analizy elementarnej oraz spektrometrii mas. Ponadto otrzymane kompleksy zostały poddane analizie rentgenostrukturalnej. W czwartym podrozdziale tej części pracy Doktorantka zamieściła szczegóły dotyczące badań strukturalnych, dość obszerny, ale istotny opis przeprowadzonych pomiarów kinetycznych oraz podstawowe informacje dotyczące wyznaczenia stałej dysocjacji kwasowej akwapochodnych kompleksów oraz obliczeń z użyciem metody DFT. Tutaj mam wątpliwości co do trafności zatytułowania tego podrozdziału *Metody analityczne*.

Ostatni podrozdział (5) zawarty w *Części eksperymentalnej* na 98 stronach rozprawy obejmuje sukcesywnie przedstawione uzyskane wyniki, ich dyskusję oraz dwustronicowe podsumowanie i wnioski. W mojej ocenie jest to najważniejsza i najciekawsza część pracy. Doktorantka rozpoczęła prezentację uzyskanych wyników od charakterystyki otrzymanych związków kompleksowych Ru(II) pod względem strukturalnym. Sukcesem przeprowadzonych badań jest wyizolowanie kryształów wszystkich otrzymanych soli kompleksowych $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{terpy})(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}](\text{Cl}/\text{ClO}_4)$, co pozwoliło na ustalenie ich struktury krystalicznej za pomocą

rentgenowskiej analizy strukturalnej. Kolejna część pracy poświęcona jest badaniom kinetyczno-mechanistycznym reakcji substytucji liganda jednodonorowego w kompleksach. Uzyskane dane kinetyczne Doktorantka opracowywała przy wykorzystaniu programu EnzFitter. Za pomocą elektronowej spektroskopii absorpcyjnej Doktorantka prześledziła proces spontanicznej akwatacji badanych kompleksów, a także na podstawie miareczkowania spektrofotometrycznego wyznaczyła wartości pK_a akwapochodnych wymienionych kompleksów. Następnie przeprowadziła szczegółowe badania szybkości reakcji substytucji powstających akwakompleksów jonem chlorkowym, cyjankiem, tiomocznikiem oraz N,N'-dimetylotiomocznikiem w funkcji stężenia liganda oraz w uzasadnionych przypadkach pH roztworu. W celu wyjaśnienia mechanizmów reakcji wyznaczyła termiczne i ciśnieniowe parametry aktywacji substytucji ligandów. Przeprowadzone obliczenia DFT pozwoliły na zaproponowanie dla reakcji wymiany wody oraz substytucji akwapochodnych kompleksów ligandami o różnych właściwościach mechanizmu wymiennego asocjacyjnego. Ostatnie zadanie badawcze składające się na recenzowaną pracę doktorską miało na celu sprawdzenie właściwości katalitycznych polipirydylowych kompleksów Ru(II) oraz ustalenie mechanizmu katalitycznej redukcji koenzymu NAD^+ do $NADH$ w obecności mrówczanu jako źródła jonu wodorkowego. Do tego etapu badań Doktorantka wybrała dwa najbardziej labilne kompleksy ruteniu(II) $[Ru^{II}(terpy)(en)(H_2O/EtOH)]^{2+}$ i $[Ru^{II}(terpy)(ampy)(H_2O/EtOH)]^{2+}$. Po wykonaniu niezbędnych badań wstępnych, przeprowadziła systematyczne badania katalitycznej redukcji NAD^+ do $NADH$ w wodno-etanolowym medium reakcyjnym w funkcji stężenia mrówczanu, wybranych katalizatorów, NAD^+ oraz przy różnych stosunkach objętościowych rozpuszczalników. Dyskusja wyników przeprowadzona w tej części pracy jest bardzo logiczna i uporządkowana. Część *eksperymentalna* zakończona jest zwięzłym podsumowaniem, w którym Doktorantka zebrała wnioski wynikające z przeprowadzonych badań oraz wyszczególniła kluczowe osiągnięcia pracy.

Najważniejsze osiągnięcia uzyskane w trakcie realizacji zarysowanych powyżej zadań badawczych składających się na recenzowaną pracę doktorską są następujące:

1. Ustalenie struktury krystalicznej wszystkich pięciu otrzymanych kompleksów typu $[Ru^{II}(terpy)(N^{\wedge}N)Cl](Cl/ClO_4)$.
2. Zbadanie właściwości kwasowych akwapochodnych kompleksów Ru(II) i powiązanie tych właściwości z labilnością kompleksów.
3. Określenie wpływu efektów elektronowych i sterycznych wywoływanych przez ligandy N,N-donorowe na właściwości kwasowe kompleksów typu $[Ru^{II}(terpy)(N^{\wedge}N)(H_2O)]^{2+}$, które korelują z ich reaktywnością w procesach podstawienia liganda jednodonorowego. Wykazanie, że na szybkości reakcji akwatacji kompleksów typu $[Ru^{II}(terpy)(N^{\wedge}N)(Cl)]^+$, jak również reakcji podstawienia skoordynowanej cząsteczki wody w akwapochodnych przez chlorek, tiomocznik i N,N'-dimetylotiomocznik rosną wraz z malejącymi właściwościami π -akceptorowymi ligandów $N^{\wedge}N$.

4. Wykazanie, że badane, metalonieorganiczne polipirydylowe kompleksy rutenu(II) z etylenodiaminą i 2-(aminometylo)pirydyną są zdolne do katalizowania reakcji redukcji koenzymu NAD^+ do NADH , w obecności mrówczanu jako źródła jonu wodorkowego, a więc wykazują potencjał do ich zastosowania w funkcji katalitycznych metaloleków modelujących równowagę redoks w komórkach oraz zaproponowanie ogólnego mechanizmu cyklu katalitycznego przeniesienia wodorku.
5. Wykazanie, że elektronowe i steryczne właściwości ligandów N,N-donorowych mają wpływ na aktywność katalityczną badanych kompleksów, ale nie zmieniają mechanizmu cyklu katalitycznego konwersji NAD^+ w NADH .

W trakcie lektury recenzowanej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne pytania/zagadnienia do dyskusji:

1. W odniesieniu do części preparatywnej (rozdz. 3.1): dlaczego w przypadku kompleksu $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{tmen})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ zastosowana została procedura z użyciem innego reduktora niż w przypadku pozostałych czterech kompleksów? Ta kwestia nie jest w pracy dyskutowana.
2. Co do obliczeń metodą DFT, które jak podaje Doktorantka w rozdz. 4.4 przeprowadzono we współpracy z dr. Ralphem Puchtą z Wydziału Chemii i Farmacji Uniwersytetu Fryderyka Aleksandra w Erlangen-Norymberdze: na czym polegała ta współpraca i jaki był wkład Doktorantki w tym zakresie badań?
3. W rozdz. 5.2.2 Doktorantka stwierdziła: *dane w tabeli 6 pokazują, że właściwości ligandów dwudonorowych wpływają nie tylko na trwałość kompleksów chlorkowych, ale także na kwasowość ich akwapochodnych*. Proszę o rozwinięcie tego zagadnienia, gdyż w tabeli zawarte są jedynie wartości $\text{p}K_a$ kompleksów. Ponadto wyznaczone wartości $\text{p}K_a$ nie zostały odniesione do danych dostępnych w literaturze, więc podczas obrony proszę Doktorantkę również o informację na ten temat.
4. Na 12 rysunkach rozprawy w *Części eksperymentalnej* oraz 3 w załączonym *Aneksie* zamieszczone są elektronowe widma absorpcji dyskutowanych kompleksów. Z uwagi na brak w tekście pracy informacji na temat rodzaju przejść elektronowych, których rezultatem są obserwowane pasma proszę Doktorantkę o komentarz w tym zakresie.
5. Czy Doktorantka opierając się na zdobytej wiedzy oraz dotychczasowych doświadczeniach badawczych mogłaby zaproponować kierunki dalszych badań, które mogłyby stanowić kontynuację prac badawczych ujętych w ramach pracy doktorskiej, a w opinii Doktorantki są warte zainteresowania.

W pracy znajduję niewielką ilość błędów językowych oraz typu redakcyjnego, o których z obowiązku recenzenta wspominam, ale jako nieistotne dla meritum pracy pozwolę sobie pominąć. Doktorantka posługuje się poprawną terminologią z wyjątkiem kilku niefortunnych sformułowań. Drobne uwagi zamieszczam poniżej:

- str. 10: w wykazie stosowanych skrótów błędnie podana została nazwa liganda oznaczonego jako phen;
- w kilku fragmentach pracy pominięty jest stopień utlenienia rutenu (np. strony 17, 18, 22, 31, 34, 44, 65, 92, 94, 142), co sprawia, że zamieszczone tam informacje są niedoprecyzowane;
- praca zawiera na początku wykaz stosowanych skrótów, a mimo to, zupełnie niepotrzebnie w dalszej części pracy skróty są wyjaśniane ponownie, np. PDT str. 22, SOD str. 24, ROS str.47, RNS str. 47, RONS str. 47;
- w pracy występuje kilka niefortunnych sformułowań, np. str. 31: „Związki koordynacyjne rutenu oferują bogatą chemię”, str. 44: „Metaloorganiczne kompleksy Ru(II) oferują nową strategię projektowania bezpiecznych leków przeciwnowotworowych” trudno zgadnąć, co Autorka miała na myśli.

Pomimo wspomnianych powyżej uwag/zastrzeżeń, uważam, że pani mgr Marta Chrzanowska przygotowała interesującą i aktualną pracę doktorską.

Do pracy załączona została także prezentacja *Działalności naukowej* Doktorantki spełniająca rolę informacyjną. Zawarty został tutaj spis publikacji naukowych z udziałem Autorki, wykaz wystąpień konferencyjnych, a także informacje o przyznanych stypendiach naukowych oraz realizowanych projektach naukowych. Z załączonej do rozprawy listy publikacji naukowych wynika, że Pani mgr Marta Chrzanowska jest współautorką aż 13 opublikowanych w latach 2016-2021, bardzo dobrych artykułów w czasopismach z bazy JCR o zasięgu międzynarodowym (*Dalton Trans.*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, *J. Coord. Chem.*, *RSC Adv.*, *Inorg. Chim. Acta*, *Inorg. Chem.*, *J. Inorg. Biochem.*, *J. Comp. Chem.*, *Polyhedron*), a kolejna publikacja została wysłana do recenzji. Wyniki badań prezentowane w ramach recenzowanej pracy doktorskiej zostały przedstawione w sześciu współautorskich artykułach, co dowodzi, że rozprawa zawiera elementy nowości naukowej i oryginalności. Wyniki badań Doktorantki zostały zaprezentowane także na sześciu konferencjach międzynarodowych i dwóch krajowych w formie wystąpień ustnych i posterów. Należy również podkreślić, że Doktorantka była kierownikiem projektu badawczego przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium-17 pt. „Potencjalna rola metaloorganicznych wodorkowych kompleksów Ru(II) jako substancji modelowych do kontrolowania równowagi redoks w komórkach” oraz uczestniczyła jako stypendysta w projekcie badawczym z Narodowego Centrum Nauki Opus-19 pt. „Wyjaśnienie mechanizmu interakcji nanocząstek i nanozwiązków koordynacyjnych zachodzących na granicy faz ciało stałe-ciecz w procesach chemicznych o znaczeniu medycznym”.

Podsumowując moją recenzję rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Chrzanowskiej stwierdzam, że rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny od strony merytorycznej i edytorskiej. Zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań, ciekawą i rzetelną dyskusję uzyskanych wyników oraz poprawnie sformułowane wnioski. W świetle

wymienionych powyżej osiągnięć nie ulega wątpliwości, że wszystkie cele pracy zostały zrealizowane.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki chemiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań przez Doktorantkę, zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ust.1 *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (tj. Dz. U. 2017, poz. 1789 z późniejszymi zmianami) w związku z art. 179 *Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2018, poz. 1669 z późniejszymi zmianami). Zatem, stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Marty Chrzanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anne Kamedke